B81

(19) JAPANESE PATENT OFFICE

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11) Publication number: **63317096 A**

(43) Date of publication of application: **26.12.88**

(51) Int. Cl **C12Q 1/00**

(21) Application number: **62153656**

(22) Date of filing: **19.06.87**

(71) Applicant: **MATSUSHITA ELECTRIC IND CO LTD**

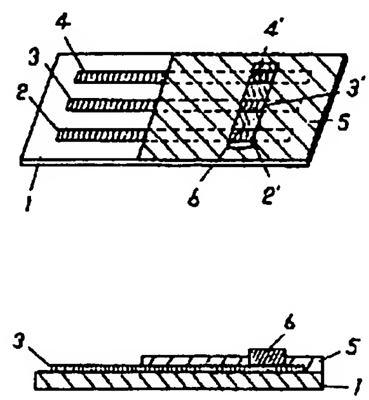
(72) Inventor: **KAWAGURI MARIKO**
NANKAI SHIRO
SUETSUGU SACHIKO
KOMATSU KIYOMI
MORIGAKI KENICHI
KOBAYASHI SHIGEO

(54) **BIOSENSOR**

(57) Abstract:

PURPOSE: To obtain a biosensor capable of readily and rapidly measuring, having high precision, inexpensively, useful in measurement of biopolymer, etc., by dissolving an enzyme and electron acceptor in an absorbing high polymer and applying the resultant solution to a specific electrode.

CONSTITUTION: An electroconductive carbon paste is printed on an insulating substrate 1 such as polyethylene terephthalate by screen printing to form an electrode system consisting of a counter electrode 2, measuring electrode and reference electrode 4. Then the electrode system is covered with an insulating paste so as to leave 2', 3' and 4' part of each electrode and an insulating layer 5 is formed. Then a mixed water solution of water absorbing high polymer such as starch, enzyme such as oxidase and electron acceptor such as potassium ferricyanide is applied to the surface of the electrode system and the applied electrode is dried to form a reactive layer 6. Then a sample such as glucose is dropped too the reactive layer 6 and response electric current is detected to measure concentration of a substrate such as glucose.



⑲日本国特許庁（JP） ⑪特許出願公開
⑫公開特許公報（A） 昭63-317096

⑤Int.Cl.⁴ 識別記号 庁内整理番号 ⑬公開 昭和63年(1988)12月26日
C 12 Q 1/00 B-6807-4B

審査請求 未請求 発明の数 1 （全3頁）

⑭発明の名称 バイオセンサ

㉑特 願 昭62-153666
㉒出 願 昭62(1987)6月19日

⑫発明者 河栗 真理子 大阪府門真市大字門真1006番地 松下電器産業株式会社内
⑫発明者 南海 史朗 大阪府門真市大字門真1006番地 松下電器産業株式会社内
⑫発明者 末次 佐知子 大阪府門真市大字門真1006番地 松下電器産業株式会社内
⑫発明者 小松 きよみ 大阪府門真市大字門真1006番地 松下電器産業株式会社内
⑫発明者 飯島 孝志 大阪府門真市大字門真1006番地 松下電器産業株式会社内
⑫発明者 小林 茂雄 大阪府門真市大字門真1006番地 松下電器産業株式会社内
⑪出願人 松下電器産業株式会社 大阪府門真市大字門真1006番地
⑭代理人 弁理士 中尾 敏男 外1名

明 細 書

1、発明の名称

バイオセンサ

2、特許請求の範囲

(1) 少なくとも測定極と対極からなる電極系を設けた絶縁性基板を備え、酵素と電子受容体と試料液の反応に際しての物質濃度変化を電気化学的に前記電極系で検知し前記基質濃度を測定するバイオセンサにおいて、前記電極系の表面に酵素および電子受容体を親水性高分子に混合して担持したことを特徴とするバイオセンサ。

(2) 電極系が、絶縁性基板上にスクリーン印刷で形成されたカーボンを主体とする材料からなる特許請求の範囲第1項記載のバイオセンサ。

(3) 電極系の表面に担持する親水性高分子が、デンプン系，カルボキシメチルセルロース系，ゼラチン系，アクリル酸塩系，ビニルアルコール系，ビニルピロリドン系，無水マレイン酸系からなる群のいずれかもしくはそれらの混合物である特許請求の範囲第1項記載のバイオセンサ。

3、発明の詳細な説明

産業上の利用分野

本発明は、種々の微量の生体試料中の特定成分について、試料液を希釈することなく迅速かつ簡易に定量することのできるバイオセンサに関する。

従来の技術

従来、血液などの生体試料中の特定成分について、試料液の希釈や撹拌などの操作を行うことなく高精度に定量する方式としては、第3図に示す様なバイオセンサが提案されている（例えば、特開昭59−166852号公報）。このバイオセンサは、絶縁性基板7にリード10，11をそれぞれ有する白金などからなる測定極8および対極9を埋設し、これらの電極系の露出部分を酸化還元酵素および電子受容体を担持した多孔体12で覆ったものである。試料液を多孔体上へ滴下すると、試料液に多孔体中の酸化還元酵素と電子受容体が溶解し、試料液中の基質との間で酵素反応が進行し、電子受容体が還元される。酵素反応終了

体、この還元された電子受容体を電気化学的に酸化し、このとき得られる酸化電流値から試料液中の基質濃度 求めることがなされていた。

発明が解決しようとする問題点

この様な従来の構成では、多孔体については、測定毎に取り替えることにより簡易に測定に供することができるが、電極系については洗浄等の操作が必要である。一方電極系をも含めて測定毎の使い捨てが可能となれば、測定操作上、極めて簡易になるものの、白金等の電極材料や構成等の面から、非常に高価なものにならざるを得ない。

本発明はこれらの点について種々検討の結果、電極系と多孔体を一体化することにより、生体試料中の特定成分を極めて容易に迅速かつ高精度に定量することのできる安価なディスポーザブルタイプのバイオセンサを提供するものである。

問題点を解決するための手段

本発明は上記問題点を解決するため絶縁性基板に少なくとも測定極と対極からなる電極系を設け、その表面に酵素および電子受容体を親水性高分子に混合して塗布して作製し、試 液を滴下することによって行なわれる反応を前記電極系で検知し試料液中の基質濃度を測定するものである。

作用

本発明によれば、電極系をも含めたディスポーザブルタイプのバイオセンサを構成することができ試料液を添加することにより、極めて容易に基質濃度を測定することができる。

しかも、電極系の表面に酵素および電子受容体を親水性高分子に混合して塗布することで、試料液を滴下すると電極の近傍ですみやかに酵素と電子受容体が溶けて反応し電極上に達し、測定の妨害となる試料中の蛋白質等は親水性高分子により妨げるため、精度の良い測定が可能となった。

実施例

以下、本発明の一実施例について説明する。

バイオセンサの一例として、グルコースセンサについて説明する。第1図は、グルコースセンサの一実施例について示したもので、構成部分の分解図である。ポリエチレンテレフタレートからなる絶縁性基板1に、スクリーン印刷により導電性カーボンペーストを印刷し、加熱乾燥することにより、対極2，測定極3，参照極4からなる電極系を形成する。次に、電極系を部分的に覆い、各々の電極の電気化学的に作用する部分となる2'，3'，4'（各1mm^2）を残す様に、絶縁性ペーストを前記同様印刷し、加熱処理して絶縁層5を形成する。

この電極系の表面に、親水性高分子としてカルボキシメチルセルロース（CMC）の1%水溶液1ccにグルコースオキシダーゼ10mg電子受容体としてフェリシアン化カリウム40mgを溶解して塗布し自然乾燥して反応層6を形成する。この反応層6にグルコース標準液を滴下して2分後に、参照極を基準にして測定極の電位をアノード方向へ+0.7Vパルス電圧を印加し5秒後の電流を測定する。この場合、添加されたグルコース標準液により親水性高分子が電極上に安定で移動しにくい層を形成し、グルコースオキシダーゼおよびフェリシアン化カリウムが溶解しグルコースと反応してフェロシアン化カリウムを生成する。そこで、上記のパルス電圧の印加により、生成したフェロシアン化カリウムの濃度に基づく酸化電流が得られ、この電流値は基質であるグルコース濃度に対応する。グルコースの標準液を滴下し応答電流を測定したところ、700mg/dlという高濃度まで良好な直線が得られた。

次に血液を試料液として前記グルコースセンサで測定した場合にも、安定した応答電流が得られた。CMCを用いないで電極上にグルコースオキシダーゼとフェリシアン化カリウムの溶液を塗布して自然乾燥し反応層を形成したところ血液を滴下すると赤血球や蛋白質などが電極表面に吸着してばらついた低い応答しか得られなかった。CMCを加えることで、電極上に一定の膜厚の安定なゲル層が形成でき、しかも赤血球や蛋白質の電極への吸着を防ぎ、ばらつきの少ない応答が得られた。膜厚について種々検討した結果、試料が数μl～数十μlと微量の場合は0.1～100μの範囲が好ましいことがわかった。0.1μ以下の膜厚では、

電極が剥離しやすいため安定なゲル層が得られず、また逆に100μ よりも厚くなると試料液の浸透が不十分でゲル化しない部分が生じた。この電極表面に薄く被覆されたCMCの層の中にグルコースオキシダーゼとフェリシアン化カリウムが均一に分布しているので、試料液を滴下するとすみやかに反応がおこり2分で反応が終了し安定した応答を測定できた。電極表面に酵素および電子受容体を親水性高分子の水溶液に混ぜて塗布し乾燥させるという非常に簡易な工程でセンサが製造できるため大量生産にメリットがあると考えられる。

電極系を形成する方法としてスクリーン印刷は、均一な特性を有するディスポーザブルタイプのバイオセンサを安価に製造することができ、特に、価格が安く、しかも安定した電極材料であるカーボンを用いて電極を形成するのに好都合な方法である。

親水性高分子としてCMCの他にもゼラチンやメチルセルロースなども使用できる。デンプン系、カルボキシメチルセルロース系，ゼラチン系，アクリル酸塩系，ビニルアルコール系，ビニルピロリドン系，無水マレイン酸系のものが好ましい。これらの高分子は、容易に水溶液とすることができるので、適当な濃度の水溶液を塗布乾燥することにより、必要な厚さの薄膜を電極上に形成することができる。

酸化還元酵素と電子受容体の組み合わせは前記実施例に限定されることはなく、本発明の趣旨に合致するものであれば用いることができる。一方、上記実施例においては、電極系として2電極方式の場合について述べたが対極と参照極からなる3電極方式でも測定は可能である。

発明の効果

このように本発明のバイオセンサは、絶縁性基板上に、電極系を印刷し、その上に酸化還元酵素と電子受容体を親水性高分子とともに塗布して反応層を形成しており、極めて容易に生体試料中の基質濃度を測定することができ、さらに電極近傍に反応層を形成することで測定のスピードアップをはかり、親水性高分子により電極表面への妨害物質の吸着を防ぎ測定精度を高めたものである。

4、図面の簡単な説明

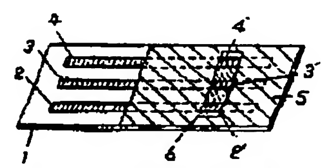
第1図は本発明の一実施例であるバイオセンサの外観図、第2図はその縦断面図、第3図は従来のバイオセンサの縦断面図である。

1……絶縁性基板、2……対極、3……測定極、4……参照極、6……反応層。

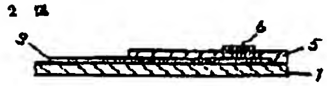
代理人の氏名 弁理士 中尾敏男 ほか1名

第1図

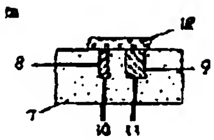
1 — 絶縁性基板
2 — 対極
3 — 測定極
4 — 参照極
5 — 絶縁層
6 — 反応層



第2図



第3図



10. Japan Patent Office 11. Patent Application Disclosure
12. Japanese Patent Disclosure Publication (A) S63-317096

51. Int. Cl. 4 Code Internal Classification No. B-6807-4B 43. Date f Publication: December 26, 1988

Request for Examination: Not requested *Number of Inventions: 1 (3 pages total)*

20. Title of Invention: Biosensor

21. Application no.: S62-153666
22. Date of Application: June 19, 1987

72. Inventors: Mariko Kawaguri, Matsushita Electric Industrial Co., Ltd., 1006 Oaza Kadoma, Kadoma, Osaka
Shiro Nankai, Matsushita Electric Industrial Co., Ltd., 1006 Oaza Kadoma, Kadoma, Osaka
Sachiko Suetsugu, Matsushita Electric Industrial Co., Ltd., 1006 Oaza Kadoma, Kadoma, Osaka
Kenichi Morigaki, Matsushita Electric Industrial Co., Ltd., 1006 Oaza Kadoma, Kadoma, Osaka
Shigeo Kobayashi, Matsushita Electric Industrial Co., Ltd., 1006 Oaza Kadoma, Kadoma, Osaka
71. Applicant: Matsushita Electric Industrial Co., Ltd., 1006 Oaza Kadoma, Kadoma, Osaka
76. Representative: Patent Attorney, Toshio Nakao and one other person

Details of the Invention

1. Title of Invention

   Biosensor

2. Scope of Patent Claims

   (1) This concerns biosensors which consist of an insulator plate equipped with at minimum of a working electrode and a counter electrode and are capable of detecting electrochemically the material concentration changes caused by the reaction of an enzyme and an electron receptor with the sample solution. The enzyme and the electron receptor are dissolved in a hydrophilic polymer and are applied on the above mentioned electrode system.

   (2) This concerns a biosensor described in the Item (1) of the Scope of Patent Claims, the electrode system of which consists of a material mainly made of carbon formed on an insulator plate by screen print process.

   (3) This concerns biosensors described in the Item (1) of the Scope of Patent Claims, the electrode surface of which is covered with a hydrophilic polymer consisting of starch, carboxymethyl cellulose, gelatin, acrylate, vinyl alcohol, vinyl pyrrolidone or maleic anhydride alone or of their mixtures.

3. Detailed Explanation of Invention

Areas of Industrial Application

This invention concerns the biosensor, which is capable of rapid and simple assay of trace amounts of specific components in biofluid samples without dilution.

Prior Art

Conventionally, a biosensor shown in Figure 3 is proposed to quantitatively assay, with high accuracy, specific components in biofluid samples such as blood without dilution or mixing (for example, see Japanese Patent Disclosure Publication, S69–185852). This biosensor consists of an insulator plate (7) on which a working electrode 8 and a counter electrode 9, both made of platinum and each connected to leads 10 and 11, respectively. The exposed part of this sensor is covered with a porous material impregnated with a redox enzyme and an electron receptor. When a sample solution is applied on the porous body, the enzyme and the electron receptor dissolve in the sample solution. They react with the substrate and activate the enzymatic reactions, which result in the reduction of the electron receptor. At the end of the enzymatic reactions, this reduced electron receptor is electrochemically oxidized. The substrate concentration in the sample is calculated from the oxidation current value thus obtained.

Problems this invention offers to solve

With such a conventional system the porous body can be easily changed for each measurement. However, the electrode system requires treatments such as rinsing. If the system including the electrodes can be made disposable after each measurement, the operation system will be made very simple. In this case, the system will be very expensive due to the cost of electrode materials such as platinum and other structural materials.

After extensive studies on these aspects, we now offer an inexpensive disposable biosensor, which can very easily, rapidly and accurately assay specific components in biofluid samples by unitizing the electrode system and the porous body.

Means to solve these problems

To solve above-mentioned problems, this invention uses an *insulator substrate on* which an electrode system, as a minimum requirement, consisting of a working electrode and a counter electrode. *The electrodes are covered with a hydrophilic* polymer with an enzyme and an electron receptor dissolved in. The electrode system *detects the reaction initiated by placing a sample solution to measure the substrate* concentration in the sample solution.

Operation

By this invention, disposable type biosensors including electrode systems can be constructed. The substrate concentration can be easily measured by adding sample solutions.

In addition, as a hydrophilic polymer containing an enzyme and an electron receptor is applied on the surface of the electrode system, the enzyme and the electron receptor can react with the placed sample near the electrode. They can reach the electrode immediately after the reaction. As proteins, which usually interfere with the measurement, are shielded by the hydrophilic polymer, high accuracy measurement became possible.

Examples of Application

In the following, we will explain the actual application of this invention.

As an example of biosensors, we will explain the glucose sensor. In Figure 1, exploded diagram of the structural body of the glucose sensor is shown. On the insulator plate made of polyethylene terephthalate (1), conductive carbon paste is printed by screen-printing. By heating and then drying, the electrode system comprising of a counter electrode (2), a working electrode (3) and a reference electrode (4) is constructed. Then, one part of the electrode system is covered and an insulation paste is printed on in the same manner so as to leave the electrochemically reactive portions of each electrode, (2'), (3'), and (4') (1 mm each) uncovered. After the heat treatment, the insulator layer (5) is formed.

On the surface of this electrode system, 1cc of 1% aqueous solution of carboxymethyl cellulose (CMC) which contains 10 mg glucose oxidase and 40 mg potassium ferricyanate (electron receptor) well dissolved is applied. The device is dried at ambiance to form the reaction layer (6). Two minutes after the application of a glucose standard solution, +0.7v pulse voltage measured against the reference electrode is applied on the working electrode in the direction of the anode. The current is measured five seconds later. In this case, the hydrophilic polymer reacts with the added glucose standard solution to form a stable, less fluid liquid layer on the electrodes. Dissolved glucose oxidase and potassium ferricyanate react with glucose to form ferrocyanate. As a result, by the application of pulse voltage as described above, the oxidation current which is related to the concentration of the produced ferrocyanate is obtained. This current reading is proportional to the glucose concentration. When glucose standard solutions of varied concentrations were tested, a good linearity was observed between the glucose concentration and the response current up to a very high glucose concentration of 700 mg/dl.

Similarly, stable response current readings were obtained when blood was used as sample solutions. When the reaction layer was constructed on the electrodes by the application and natural drying of glucose oxidase and potassium ferricyanate solutions without CMC, erythrocites and proteins adsorbed on the electrode surface to produce fluctuating low responses. Addition of CMC helps formation of a gel layer with consistent thickness on the electrode. CMC also prevents the adsorption of erythrocites and proteins and enables to produce tighter response readings. As for the

thickness of the layer, a range of 0.1 μ - 100 μ was found to be favorable for the small sample volumes of several ug - 100 ug. If the thickness was below 0.1 μ, it was difficult to form a stable gel layer because of the high fluidity of the liquid layer. On the other hand, if the thickness is above 100 μ, diffusion of sample solutions is poor and there were spots that did not form gel. As glucose oxidase and potassium ferricyanate are evenly distributed in the CMC layer constructed on the surface of the electrodes as a thin film, the reaction takes place immediately after sample addition. The reaction is completed in two minutes to produce stable response readings. As the sensor can be produced by such a simple process of application and drying of aqueous solution of a hydrophilic polymer, which contains an enzyme and an electron receptor, this process will be advantageous for mass production of the sensors.

The screen print process used here to construct the electrode system is suitable for the low cost production of disposable type biosensors with consistent characteristics. This process is also a favorable method to use carbon, which is an inexpensive and stable electrode material, to construct electrodes.

As a hydrophilic polymer, geletin or methylcellulose can be used in stead of CMC. Starches, carboxy methylcelluloses, gelatins, acrylates, vinyl alcohol, vinyl pyrrolidons and maleic anhydrides are desirable. These polymers can be easily made into aqueous solutions. By the application of their aqueous solutions with an appropriate concentration followed by drying, a thin layer with a satisfactory thickness can be formed on the electrodes.

The combination of a redox enzyme with an electron receptor is not restricted to that shown in the Example of Application. Any combinations that match the principle of this invention can be used. In addition, 2-electrode system can be used instead of 3-electrode system described in the Example of Application.

Effect of the Invention

The biosensor in this invention consists of an insulator plate on which an electrode system is printed. The reaction layer is constructed by the application of a hydrophilic polymer, which contains a redox enzyme and an electron receptor on the electrode system. It can measure the substrate concentrations in biological fluid samples. The measurement is rapid as the reaction layer is constructed close to the electrodes. By using hydrophilic polymer, adsorption of interfering substances on the surface of electrodes was prevented and the accuracy of measurement was increased.

4. Simple Explanation of Figures

Figure 1 is a bird's-eye view of a typical biosensor of this invention described in Example of Applications. Figure 2 is its lengthwise cross section. Figure 3 is the lengthwise cross section of a conventional biosensor.

Legend: 1=insulator plate, 2=counter electrode, 3=working electrode, 4=reference electrode, 5=reaction layer.

Name of the representative: Patent Attorney, Toshio Nakao and one other person.

[see diagram]

Figure 1
Figure 2
Figure 3

1... Insulator plate
2... Counter electrode
3... Working electrode
4... Reference electrode
5... Insulation layer
6... Reaction layer